



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0063343  
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 09월 09일  
Date of Application SEP 09, 2003

출원인 : 학교법인 포항공과대학교 외 2명  
Applicant(s) POSTECH FOUNDATION, et al.



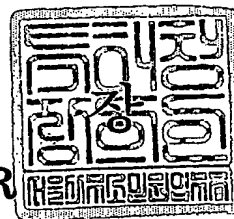
2004 년 09 월 13 일

특

허

청

COMMISSIONER



BEST AVAILABLE COPY

## 【서지사항】

**【서류명】** 특허출원서  
**【권리구분】** 특허  
**【수신처】** 특허청장  
**【제출일자】** 2003.09.09  
**【발명의 명칭】** 서방성 미립구 형태의 IL-12 면역증강제를 포함하는 백신 조성물 및 그 미립구를 이용하여 면역증강 효과를 증대시키는 방법  
**【발명의 영문명칭】** Vaccine composition comprising IL-12 adjuvant encapsulated in controlled-release micropshere and method for improving the adjuvant effect of IL-12 using the said microsphere  
**【출원인】**  
**【명칭】** 학교법인 포항공과대학교  
**【출원인코드】** 2-1999-900096-8  
**【출원인】**  
**【명칭】** 주식회사 제넥신  
**【출원인코드】** 1-1999-058655-9  
**【출원인】**  
**【명칭】** 주식회사 프로젠  
**【출원인코드】** 1-2000-012053-5  
**【대리인】**  
**【성명】** 손민  
**【대리인코드】** 9-1999-000420-6  
**【포괄위임등록번호】** 2001-056342-0  
**【포괄위임등록번호】** 2002-005985-0  
**【포괄위임등록번호】** 2001-055508-1  
**【발명자】**  
**【성명의 국문표기】** 성영철  
**【성명의 영문표기】** SUNG,Young Chul  
**【주민등록번호】** 560507-1010410  
**【우편번호】** 790-310  
**【주소】** 경상북도 포항시 남구 대잠동 현대이동타운 101동 601호  
**【국적】** KR

## 【발명자】

【성명의 국문표기】 박수형  
【성명의 영문표기】 PARK, Su Hyung  
【주민등록번호】 780430-1080411  
【우편번호】 134-072  
【주소】 서울특별시 강동구 명일2동 44 신동아아파트 6동 1101호  
【국적】 KR

## 【발명자】

【성명의 국문표기】 장 준  
【성명의 영문표기】 CHANG, Jun  
【주민등록번호】 670318-1559111  
【우편번호】 790-751  
【주소】 경상북도 포항시 남구 지곡동 755번지 교수아파트 6동 904호  
【국적】 KR

## 【발명자】

【성명의 국문표기】 손종문  
【성명의 영문표기】 SON, Jong Moon  
【주민등록번호】 630630-1144415  
【우편번호】 403-010  
【주소】 인천광역시 부평구 부평동 동아 APT 26동 1403호  
【국적】 KR

## 【발명자】

【성명의 국문표기】 이성희  
【성명의 영문표기】 LEE, Sung Hee  
【주민등록번호】 590906-1387114  
【우편번호】 151-815  
【주소】 서울특별시 관악구 봉천11동 179-58 현대아파트 101동 306호  
【국적】 KR

## 【발명자】

【성명의 국문표기】 김원배  
【성명의 영문표기】 KIM, Won Bae  
【주민등록번호】 470801-1011928

【우편번호】	135-270
【주소】	서울특별시 강남구 도곡동 476-6 대림아크로빌 A-1801
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김병문
【성명의 영문표기】	KIM,Byong Moon
【주민등록번호】	590310-1011123
【우편번호】	135-270
【주소】	서울특별시 강남구 도곡동 902-8 동신아파트 다동 401호
【국적】	KR
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인 손민 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	20 면 29,000 원
【가산출원료】	25 면 25,000 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	0 항 0 원
【합계】	54,000 원
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통

**【요약서】****【요약】**

본 발명은 병원성 항원 및 서방성 미립구에 봉입된 인터루킨-12(IL-12)를 포함하는 백신 조성물에 관한 것으로서, 면역증강제로 사용되는 IL-12를 미립구에 봉입함으로써 체내에서 서방출되어 면역증강제의 효과를 극대화시킬 수 있다. 또한, 본 발명은 서방성 미립구에 봉입된 IL-12를 사용하여 면역증강 효과를 증대시키는 방법에 관한 것이다.

**【대표도】**

도 3a

**【색인어】**

서방성 미립구, IL-12, 백신 조성물, 면역증강제

## 【명세서】

## 【발명의 명칭】

서방성 미립구 형태의 IL-12 면역증강제를 포함하는 백신 조성물 및 그 미립구를 이용하여 면역증강 효과를 증대시키는 방법{Vaccine composition comprising IL-12 adjuvant encapsulated in controlled-release microsphere and method for improving the adjuvant effect of IL-12 using the said microsphere}

## 【도면의 간단한 설명】

도 1은 B형 간염 바이러스(HBV)의 표면 항원인 HBsAg과 IL-12 봉입 미립구를 피하주사 방법으로 투여한 후 혈액 내의 총 IgG, IgG1, IgG2a 수준을 anti-S ELISA 방법을 이용하여 항체 면역반응을 관찰한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 1a 내지 도 1f에서 각각의 그룹에는 다음과 같은 조성물이 투여되었다:

- 그룹 1: HBsAg (0.5ug);
- 그룹 2: HBsAg (0.5ug)+공미립구;
- 그룹 3: HBsAg (0.5ug)+공미립구+IL-12 (0.1ug);
- 그룹 4: HBsAg (0.5ug)+IL-12 봉입 미립구 (0.1ug).

도 2는 항원의 투여량을 달리하여 면역시킨 후 미립구의 면역증강 효과를 anti-S ELISA 방법을 통하여 관찰한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 2a 내지 도 2c에서 각각의 그룹에는 다음과 같은 조성물이 투여되었다:

- 그룹 1: HBsAg (0.1ug);

그룹 2: HBsAg (0.1ug)+IL-12 봉입 미립구 (0.1ug);

그룹 3: HBsAg (0.5ug);

그룹 4: HBsAg (0.5ug)+IL-12 (0.1ug);

그룹 5: HBsAg (0.5ug)+IL-12 봉입 미립구 (0.1ug);

그룹 6: HBsAg (2.5ug);

그룹 7: HBsAg (2.5ug)+IL-12 봉입 미립구 (0.1ug).

도 3은 HBsAg과 IL-12 봉입 미립구를 피하주사 방법으로 투여한 후 분리한 CD8+ T 세포를 HBV S 특이 CTL 에피토프인 IPQSLDSWWTSL로 자극하여 IFN- $\gamma$  ELISPOT 검정한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 3a에서 각각의 그룹에는 다음과 같은 조성물이 투여되었다:

그룹 1: HBsAg (0.5ug);

그룹 2: HBsAg (0.5ug)+공미립구;

그룹 3: HBsAg (0.5ug)+공미립구+IL-12 (0.1ug);

그룹 4: HBsAg (0.5ug)+IL-12 봉입 미립구 (0.1ug).

도 3b 및 도 3c에서 각각의 그룹에는 다음과 같은 조성물이 투여되었다:

그룹 1: HBsAg (0.5ug);

그룹 2: HBsAg(0.5ug)+IL-12 (0.1ug);

그룹 3: HBsAg(0.5ug)+IL-12 봉입 미립구(0.1ug);

그룹 4: HBsAg (2.5ug);

그룹 5: HBsAg(2.5ug)+IL-12 봉입 미립구(0.1ug).

도 4는 항원의 종류, 형태, 면역 경로를 달리하여 면역시킨 후 미립구의 면역증강 효과를 FACs를 이용한 세포내 염색 (intracellular staining) 방법을 통하여 관찰한 결과를 나타내는 것이다. 호흡기 합포체 바이러스 (respiratory syncytial virus) 특이 CTL 에피토프로 알려진 M2/82-90 펩타이드와 미립구를 비강 경로로 2주 간격으로 2회 면역하였다. 도 4a 및 도 4b에서 각각의 그룹에는 다음과 같은 조성물이 투여되었다:

공미립구 첨가 그룹 1: M2/82-90 (20ug) +공미립구;

IL-12 봉입 미립구 첨가 그룹 2: M2/82-90 (20ug) +IL-12 봉입 미립구 (0.1ug).

도 5는 IL-12 DNA의 면역증강제로서의 효과와 IL-12 단백질 봉입 미립구의 면역증강제로서의 효과를 비교하기 위해서 HBsAg과 IL-12 DNA 또는 IL-12 단백질 봉입 미립구를 투여한 후 혈액 내의 총 IgG, IgG1, IgG2a 수준을 anti-S ELISA 방법을 이용하여 항체 면역반응을 관찰한 결과를 나타내는 그래프이다. IL-12 DNA는 근육주사 방법으로 투여되었고, HBsAg과 IL-12 단백질 봉입 미립구는 피하주사 방법으로 투여되었다. 도 5에서 각각의 그룹에는 다음과 같은 조성물이 투여되었다:

그룹 1: HBsAg (0.5ug);

그룹 2: HBsAg (0.5ug) + ACP30 mIL-12 (10ug);

그룹 3: HBsAg (0.5ug) + IL-12 봉입 미립구 (0.1ug).



## 【발명의 상세한 설명】

## 【발명의 목적】

## 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- 32> 본 발명은 병원성 항원 및 서방성 미립구에 봉입된 IL-12를 포함하는 면역 반응을 증대시키기 위한 백신 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 서방성 미립구에 봉입된 IL-12를 사용하여 면역증강 효과를 증대시키는 방법에 관한 것이다.
- 33> 면역 시스템은 병원체를 공격하기 위해 많은 메카니즘을 이용하지만 이들 메카니즘 모두가 면역화 후에 활성화되는 것은 아니다. 백신화에 의해 유도되는 예방 면역은 병원체에 저항성을 나타내거나 이를 조절하거나 제거하는 적합한 면역 반응을 유도하기 위한 백신의 능력에 의존적이다. 병원체에 따라, 세포성 또는 체액성 면역 반응을 요구하며, 이는 면역화 후 전개되는 T 세포의 특성에 의해 결정된다. 예를 들어 많은 세균, 원생동물 및 세포내 기생체 및 바이러스 감염은 예방을 위해 강력한 세포성 면역 반응을 요구하는 반면, 기생충과 같은 다른 병원체는 주로 체액성 또는 항체 반응에 의존한다.
- 34> 면역증강제(adjuvant)는 병원성 유기체 등을 포함한 이물질에 대한 면역 반응을 증대시키는 제제이다. 적합한 면역증강제는 숙주에게 있어 면역원은 아니지만 면역계의 세포의 활성을 증대시킴으로써 면역을 강화하는 제제를 포함한다. 면역증강제는 항원의 표면적을 증가시키거나, 체내에서 항원의 정체를 연장시켜 림프 시스템이 항원에 접근할 수 있도록 하거나, 항원 방출을 지연시키거나, 항원을 대식구에 표적화시키거나, 대식구를 활성화시키거나, 면역 시스템 세포의 비-특이적 활성화를 유도하는 것을 포함하여 다양한 방법으로 작용할 수 있는 것으로 보고되었다 (H. S. Warren et al., Annu. Rev. Immunol., 4:369 (1986)).

- 35> 전형적인 면역증강제는 물 및 오일 에멀전, 예를 들어 프로인트(Freund) 면역증강제, 및 화학적 화합물, 예를 들어 수산화알루미늄 또는 알루미늄을 포함한다. 현재 유일하게 실용적으로 이용되는 것은 알루미늄(alum)을 이용한 방법이다. 하지만, 알루미늄을 단백질에 결합시켜 체내에 주입했을 경우 단백질의 지속적인 방출을 유도할 수는 있지만, 알루미늄 자체가 항원 특이 면역 반응을 Th2 면역반응으로 전환시킨다는 특징을 갖는다. 일반적으로, 병원성 항원에 대한 예방 면역반응으로 Th2 면역반응 보다는 Th1 면역반응이 중요시 된다는 점을 고려할 때 알루미늄의 사용은 한계를 갖는다.
- 36> 현재, 면역반응 유도에 관여하는 사이토카인을 항원과 함께 전달하여 면역증강 효과를 얻고자 하는 방법이 연구되고 있다. 이러한 범주에 속하는 면역증강제는 인터루킨과 같은 사이토카인, 예를 들어 인터루킨 1 내지 12를 포함한다. 또한, 인터루킨과 같은 메커니즘을 따르지 않지만 이러한 범주에 포함되는 면역증강제로는 인터페론, 특히 감마 인터페론, 알파 인터페론, 종양괴사인자, 과립구-대식구-콜로니 자극 인자(GM-CSF) 등이 포함된다.
- 37> 상기한 바와 같은 사이토카인을 단백질 형태로 체내에 주입하였을 경우 짧은 반감기 또는 불안정 등의 원인에 의해 쉽게 체내에서 제거되는 문제점이 있다. 기존의 연구에 의하면 사이토카인의 지속적인 존재가 항원 특이 면역반응을 효율적으로 유도하는 데에 중요하다고 알려져 있기 때문에(Sanjay Gurunathan et al., Nature Medicine 1998, 4:1409~1415), 이를 극복할 수 있는 방법의 개발이 효과적인 백신 개발을 위해서 필수적으로 요구된다.

**【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】**

- <38> 본 발명자는 면역증강제로 사용되는 IL-12를 체내에서 천천히 지속적으로 방출할 수 있는 미립구의 형태로 백신 조성물에 사용함으로써, 이러한 IL-12 봉입 미립구가 미립구에 봉입되지 않은 단백질 형태 또는 DNA 형태와 비교하여 소량으로 사용하더라도 지속적으로 월등히 증가된 항원 특이 항체반응과 CTL 반응을 유도한다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- <39> 따라서, 본 발명의 목적은 서방성 미립구에 봉입된 IL-12를 면역증강제로서 백신 조성물에 사용함으로써 면역증강 효과를 극대화시키는 것이다.

**<40> 발명의 요약**

- <41> 본 발명은 병원성 항원 및 서방성 미립구에 봉입된 IL-12를 포함함을 특징으로 하는 면역 반응을 증대시키기 위한 백신 조성물에 관한 것이다.
- <42> 본 발명의 백신 조성물에 포함되는 병원성 항원은 바이러스, 세균, 기생체 또는 진균 기원의 것이 바람직하다. 이러한 병원성 항원은 단백질 또는 펩타이드 형태가 바람직하다.
- <43> 본 발명의 백신 조성물에 포함되는 IL-12는 재조합 IL-12가 바람직하게 사용되고, 백신 조성물은 바람직하게는 피하 또는 비강 투여되며, 본 발명의 백신 조성물에 포함되는 서방성 미립구는 바람직하게는 이중 에멀전 용매 증발법에 의해 제조된다.
- <44> 또한, 본 발명은 병원성 항원을 포함하는 백신 조성물에 서방성 미립구에 봉입된 IL-12를 면역증강제로 사용함을 특징으로 하여, 면역증강 효과를 증대시키는 방법에 관한 것이다.

## 【발명의 구성 및 작용】

- 45> 하나의 양태로서, 본 발명은 병원성 항원 및 서방성 미립구에 봉입된 IL-12를 포함하는 면역 반응을 증대시키기 위한 백신 조성물을 제공한다.
- 46> 본 발명의 백신 조성물은 면역증강제로서 사용되는 IL-12를 서방성 미립구에 봉입시킨 형태로 포함함으로써 병원성 항원의 면역 반응을 증대시킬 수 있다.
- 47> 본원에서 사용된 용어 '증대 (enhance)'는 병원체에 대한 기존 면역 반응을 강화시키는 것을 의미하며, 또한 병원체에 대해 면역 반응을 개시하는 것을 포함할 수 있다.
- 48> 본원에서 사용된 용어 '병원성 항원 (pathogenic antigen)'은 이에 대한 면역 반응이 유도되는 병원성 미생물로부터 기원한 항원을 의미하며, 이러한 병원성 미생물은 예를 들어 세포 내 기생체, 예를 들어 바이러스, 세균 또는 원생동물, 세포외 기생체, 예를 들어 기생충 또는 세균을 포함할 수 있다.
- 49> 본원에서 사용된 용어 '면역증강 효과 (adjuvant effect)'란 항원(antigen) 또는 면역원 (immunogen)과 함께 투여되었을 때 면역반응을 증대시키는 효과를 말한다.
- 50> 상기한 병원성 미생물로부터의 병원성 항원은 단백질 또는 이의 단편(예: 단백질 분해 단편), 펩타이드(예: 합성 펩타이드, 폴리펩타이드), 당단백질, 탄수화물(예: 폴리사카라이드), 리피드, 글리코리피드, 합텐 결합체, 전체 유기체(사멸되거나 약독화된 유기체) 또는 이의 일부, 독소 및 독소이드 등을 포함한다.
- 51> 또한, 병원성 항원은 병원성 미생물로부터의 항원을 암호화하는 DNA 서열일 수 있다. 이들 DNA 서열은 적합한 프로모터 서열과 함께 하는 경우 사이토카인 면역증강제와 함께 항원

으로 직접적으로 사용될 수 있다. 달리, 이러한 DNA 서열은 병원성 미생물의 다른 백신 스트레인에 도입되어 생체내에서 발현시에 항원을 제공할 수 있다.

52> 병원성 항원은 다양한 병원체 또는 유기체로부터 수득되거나 유도될 수 있다. 예를 들어 세균(예: 살모넬라 두블린(*Salmonella dublin*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 바실러스(*Bacillus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 보르데텔라(*Bordetella*), 리스테리아(*Listeria*), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*), 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 에이치. 인플루엔자(*H. influenza*) 등), 바이러스(예: B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 급성 호흡기 바이러스, 홍역 바이러스(*measles virus*), 폴리오바이러스(*poliovirus*), 사람 면역 결핍 바이러스(*human immunodeficiency virus*), 인플루엔자 바이러스(*influenza virus*), 파라인플루엔자 바이러스(*parainfluenza virus*), 호흡기 합포체 바이러스(*respiratory syncytial virus*), 단순포진 바이러스(*herpes simplex virus*), 에볼라 바이러스(*Ebola virus*), 임파구성 맥락수막염 바이러스(*lymphocytic choriomeningitis virus*), 뮤린 레트로바이러스(*murine retrovirus*), 광견병 바이러스(*Rabies virus*), 두창 바이러스(*Smallpox virus*), 아데노바이러스(*Adenovirus*), 바리셀라-조스터 바이러스(*Varicella-zoster virus*), 엔테로바이러스(*Enterovirus*), 로타바이러스(*Rotavirus*), 황열병 바이러스(*Yellow Fever virus*) 등), 미코박테리아(예: 미코박테리움 튜베로쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 등), 기생체(예: 레이슈마니아(*Leishmania*), 쉬스토솜(*Schistosomes*), 트란파노솜(*Tranpanosomes*), 톡소플라스마(*toxoplasma*), 뉴모시스티스(*pneumocystis*) 등) 및 진균(예: 히스토플라스마(*Histoplasma*), 칸디다(*Candida*), 크립토코커스(*Cryptococcus*), 코시디오데스(*Coccidiodes*), 아스퍼길루스(*Aspergillus*) 등) 등으로부터 수득되거나 유도될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

- 53> 특히, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 사람 면역 결핍 바이러스, 인플루엔자 바이러스와 같은 만성 질환을 일으키거나 높은 변이율(mutation rate)를 갖는 바이러스의 경우 항체 면역 반응 보다 Th1-타입 T 세포 면역 반응이 예방 또는 바이러스 제거에 중요하다고 알려져 있으며, 이러한 면역 반응을 유도하는데에 IL-12가 필수적인 것으로 알려져 있다. 또한, 미코박테리움 튜베로쿨로시스와같은 세균의 경우에도 IL-12에 의한 T 세포 면역 반응 증가가 예방에 중요한 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 발명의 백신 조성물에 포함되는 병원성 항원은 B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 사람 면역 결핍 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 미코박테리움 기원의 것이 바람직하다.
- 54> 바람직하게는, 본 발명의 목적상 본 발명의 백신 조성물에 사용되는 병원성 항원은 바이러스로부터 수득되거나 유도된 것이다. 예를 들어, 간염 바이러스, 급성 호흡기 바이러스, 홍역 바이러스, 폴리오바이러스, 사람 면역 결핍 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 호흡기 합포체 바이러스 등을 포함한 다양한 바이러스로부터 기원한 병원성 항원이 포함될 수 있다.
- 55> 본 발명의 백신 조성물에 포함되는 병원성 항원은 당 분야에 공지된 기술을 이용하여 수득될 수 있다. 예를 들어, 항원은 병원체로부터 직접적으로 분리(정제)되거나, 화학적 합성 방법을 이용하여 유도되거나, 재조합 방법을 이용하여 수득될 수 있다. 또한, 항원은 시판되는 것으로부터 수득될 수 있다. 본 발명에 사용하기에 적합한 항원은 하나 이상의 B 및/또는 T 세포 에피토프(예: T 헬퍼 세포 또는 세포독성 T 세포 에피토프)를 포함하는 것이다. 본 발명의 조성물에 사용하기에 적합한 다른 항원은 당업자에 의해 결정될 수 있다.
- 56> 바람직하게는, 본 발명의 백신 조성물은 단백질 또는 펩타이드 형태의 병원성 항원을 포함하며, 단백질 또는 펩타이드는 직접적으로 분리되거나 화학 합성되거나 재조합 방법에 의해 수득

된 것을 이용할 수 있다. 보다 바람직하게는, 재조합 방법에 의해 생산된 단백질 또는 펩타이드가 사용될 수 있다.

- 57> 상기한 바와 같은 본 발명의 백신 조성물에 포함되는 병원성 항원은 지속적 방출을 위해 이들 성분을 마크로분자 복합체, 나노캡슐, 미립구, 비드, 수중유 에멀전, 마이셀, 혼합 마이셀, 리포솜, 재봉합 적혈구 등으로 이루어진 그룹중에서 선택된 분산 시스템에 포함시킬 수 있다.
- 58> 본 발명의 백신 조성물에 면역증강제로서 포함되는 인터루킨-12 (IL-12)는 세포성 면역이 요구되는 경우 백신 효능을 증가시키는 주요 요소 중의 하나로 공지되어있다.
- 59> IL-12는 적절한 자극이 주어진 후 대식세포, 단핵구와 같은 항원 제공 세포(Antigen presenting cell, APC)에 의해 분비되며, 생체 내에서 일어나는 각종 면역 반응을 조절하는 역할을 한다. 구체적으로, IL-12는 T 헬퍼 1 (Th1) 세포와 NK (natural killer cell) 세포의 분화, 다양한 사이토킨 생성의 조절, Th1 세포에 의한 면역 반응의 상승, CD8+ T 세포의 분화, 그리고 혈액 기원 세포 (hematopoietic cell) 증식 등의 넓은 분야에 걸친 기능을 가질 뿐 아니라 (Hsieh, C. S., et al., *Science*, 260:547-549, 1993), 특히 CTL 세포 (cytotoxic T lymphocyte)와 NK 세포의 가수 분해 능력 (Robertson, M. J., and J. Ritz., *Oncologist*, 1:88-97, 1999; Trinchieri, G., *Annu. Rev. Immunol.*, 13:251-276, 1995)을 증진시킴으로써 면역 반응을 조절하는 데 중요한 역할을 한다. 지금까지의 보고에 의하면 후천성 면역 결핍증 (AIDS) 환자의 경우 생물학적 활성을 가진 IL-12의 합성이 약 5배가 감소하였으며 (Chehimi, J. et al., *J. Exp. Med.*, 179:1361-1366, 1994), 또한 IL-12 수용체 유전자가 결손된 사람에게서는 미코박테리아 (mycobacteria)에 대한 면역성이 상당히 감소되어 있음 (de Jong, R. et al.,

*Science*, 280:1435-1438, 1998)이 관찰되었다. 이러한 IL-12의 작용은 바이러스나 박테리아 그리고 다양한 종양에 대한 강력한 생체 내 면역 반응을 초기에 유도할 수 있기 때문에 이를 이용한 다양한 치료제의 개발도 활발히 진척되고 있는 추세이다.

- 60> IL-12가 위에서 제시한 여러 가지 세포성 면역 반응을 필요로 하는 질병에 효과적인 백신 또는 치료제로 사용될 수 있는 또 다른 이유로 제시될 수 있는 것은 IL-12가 생체 내에서 기억 Th1 세포 (memory Th1) 및 기억 CTL 세포 (memory CTL)의 증식에 관련이 있다는 가설에 기초하고 있다 (Stobie, L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:8427-8432, 2000; Mortarini, R. et al., *Cancer Res.*, 60:3559-3568, 2000; Mbawuike, I.N. et al., *J. Infect. Dis.*, 180:1477-1486, 1999). 특별히 다양한 종양의 치료시 가장 문제가 되고 있는 전이나 재발의 문제에 초점을 맞추어 본다면 기억 면역 반응(memory immune response)의 유도는 필수 불가결한 것이라고 볼 수 있다. 그러나 현재까지 IL-12가 이러한 효과를 보이는 것에 대한 정확한 기작은 밝혀져 있지 않다. 하지만 최근의 몇몇 보고에 의하면 IL-12에 의한 Th1 세포 분화 과정에서 증가되는 IFN- $\gamma$ 가 항증식 효과 (antiproliferative effect)를 나타낼 수 있기 때문에, IL-12가 CD4+ T 세포의 아포토시스 (apoptosis)를 저해함으로써 기억 면역 반응이 유도될 수 있을 것이라는 기작이 제시되고 있다 (Fuss, I. J. et al., *Gastroenterology*, 117:1078-1088, 1999; Marth, T. et al., *J. Immunol.* 162:7233-7240, 1999). 또한, IL-12에 의해서 증가되는 IFN- $\gamma$ 가 기억 CD8+ T 세포의 강력하고 선택적인 자극에 관여하는 IL-15의 발현을 자극할 수 있으므로 (Zhang, X. et al., *Immunity* 8:591-599, 1998) 기억 면역 반응이 유도될 수 있을 것이라는 가설도 제기되고 있다. 이러한 보고들을 근거로 할 때 IL-12는 단지 초기 면역 반응 뿐 아니라 기억 면역 반응에도 관여할 수 있으므로 백신 면역화에 있어서 특별히 유용하게 사용될 가능성이 제기되고 있다.



- <61> 면역증강제로서의 IL-12는 다른 사이토카인에 의해 나타나는 조절되지 않는 생산을 유발하지 않으며, 사람으로부터 기원할 수 있어 다른 감작화를 유발하지 않고, 피하 주사시에 명백한 부작용이 없는 것으로 보고되었다.
- <62> IL-12를 DNA 형태로 투여하는 경우 내생 (endogeneous) 발현이 유도되어 단백질 형태로 투여하는 경우 보다 지속적인 발현이 가능하므로, 문헌 (Sanjay Gurunathan et al., Nature Medicine, 4:1409-1415, 1988)에서는 레이슈마니아 메이저 (Leishmania major) 또는 미코박테리움 투베르쿨로시스 (Mycobacterium tuberculosis) 등과 같은 세포내 감염에 대해 항원 단백질과 함께 DNA 형태의 IL-12를 함께 투여함으로써 보다 지속적인 면역반응을 유도하였다고 보고하였다.
- <63> 그러나, 이러한 보고와는 달리, 본 발명자들은 면역증강제로 사용되는 IL-12를 단백질 형태로 서방성 미립구에 봉입시켜 백신 조성물에 사용하는 경우 DNA 형태의 IL-12를 사용했을 때 보다 상당히 적은 양을 사용하더라도 지속적으로 월등히 높은 항체 및 세포성 면역반응을 나타낸다는 것을 확인하였다. 구체적으로, 본 발명자들은 IL-12가 봉입된 미립구를 HBV 예방 백신으로 사용되는 재조합 HBsAg와 함께 첨가하여 생쥐에 피하 투여하여, HBsAg 단독 사용이나 미립구가 아닌 단백질 형태로만 제공된 IL-12 또는 DNA 형태의 IL-12 사용에 비해 월등히 증가된 항체반응과 CTL 반응이 유도되었고, Th1 면역반응 역시 증가하였음을 입증하였으며, 또한 IL-12가 봉입된 미립구를 RSV의 M2/82-90 펩타이드와 함께 비강 투여하여 월등히 증가된 CTL 반응이 유도되었음을 입증하였다.
- <64> 따라서, 본 발명의 백신 조성물에 포함되는 서방성 미립구에 봉입된 IL-12는 단백질 형태의 것을 지칭한다.

- 35> 면역증강제로서 백신 조성물에 포함되는 IL-12를 단백질 형태로 사용하는 경우 DNA 형태의 IL-12를 사용하는 것과 비교하여 다음과 같은 잇점이 있다: 단백질 형태의 사이토카인은 피하 경로를 통해 체내에 주입하나, DNA 형태는 피하 경로로 주입할 경우 효과가 만족스럽지 못한 것으로 알려져 있다. 이에, 단백질 형태의 백신은 피하 경로로 투여하고 DNA 형태의 면역증강제인 IL-12는 근육내 주입하는 경우, 항원과 면역증강제가 함께 존재하는 것이 중요하기 때문에 목적하는 효과를 얻기 어렵다. 또한, IL-12가 면역증강제로 작용하기 위해서는 초기 항원 제시 과정에서부터 그 존재가 요구되나 DNA 형태의 IL-12를 근육내 경로로 면역화시키는 경우 체내 (일반적으로 근육세포)에서 발현이 되어 목적하는 장소에 이동하기까지 일정 시간이 소요된다. 특히, 단백질 형태의 IL-12를 미립구에 봉입시켜 면역증강제로서 사용하는 경우 체내 방출 지속 기간을 미립구의 조성을 변화시킴으로써 다양하게 조절할 수 있는 반면, DNA 형태의 IL-12는 발현 수준이 너무 낮고 발현된 IL-12의 지속 시간을 조절할 수 없으며 아직까지 임상에 사용하기에는 안전성 측면에서 좀더 많은 연구가 요구된다.
- 66> 본원에서 사용된 용어 'IL-12'는 IL-12 단백질, 이의 서브유닛, 서브유닛의 멀티머, IL-12의 작용성 단편, 및 IL-12의 작용성 등가물 및/또는 동족체를 의미한다. IL-12의 작용성 단편이란, 항원과 함께 투여되었을 때 항원에 대해 면역 반응을 유도하는 단편을 포함한다. 또한, IL-12의 작용성 등가물 또는 동족체는, 생성된 IL-12 생성물이 IL-12와 유사한 활성을 갖도록 변형된 IL-12 단백질, 즉 항원과 함께 투여되었을 때 항원에 대한 면역 반응을 유도할 능력을 갖는 변형된 IL-12 단백질을 포함한다.
- 67> IL-12는 다양한 기원으로부터 수득되거나 공지된 기술을 이용하여 합성될 수 있다. 예를 들어, IL-12는 천연 기원(예: 사람과 같은 포유동물)으로부터 정제(분리)되거나 화학적 합성에 의해 생성되거나 재조합 DNA 기술에 의해 생성될 수 있다. 또한, IL-12는 시판 공급원으로부터

터 수득될 수 있다. 특히, 사람 기원의 분리 또는 합성되거나 재조합 DNA 기술로 생성된 것이 바람직하게 사용될 수 있다.

- 68> 면역증강제로서의 IL-12는 약 1ng 내지 약 20ug, 보다 바람직하게는 약 100ng 내지 5ug의 범위 내에서 사용될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- 69> 단백질은 대다수가 구강 투여시 위의 산성 환경 하에서 활성 구조를 잃게 되거나 효소적 분해로 인하여 파괴되고 또한 위 또는 장 점막에서 흡수되는 비율도 상당히 낮다. 이로 인해 대부분의 단백질 약물은 비경구 투여, 즉 정맥주사, 피하주사, 근육주사 등의 방법으로 투여되는데 이러한 경로로의 투여 후에도 생체 내에서의 짧은 반감기로 인해 반복적으로 계속 주사하여야 한다.
- 70> 이러한 단백질의 조절 방출을 위해 이들 성분을 마크로분자 복합체, 나노캡슐, 미립구, 비드, 수중유 에멀전, 마이셀, 혼합 마이셀, 리포솜, 재봉합 적혈구 등으로 이루어진 그룹중에서 선택된 분산 시스템에 포함시킬 수 있다.
- 71> 단백질의 서방성 주사 제형에 가장 많이 사용되는 생체 분해성 고분자는 폴리락타이드 (Polylactide, PLA), 폴리글라이콜라이드(Polyglycolide, PGA)와 이들의 공중합체인 폴리(락타이드-코-글라이콜라이드)(Polylactide-co-glycolide), PLGA) 등의 폴리에스테르(Polyester) 계열의 합성 고분자이다. 이러한 폴리 에스테르 계열의 합성 고분자 이외에도 지질, 지방산, 왁스 및 그들의 유도체를 포함하는 리피드류, 알부민, 젤라틴, 콜라젠, 피브린 등의 단백질류, 알긴산, 키틴, 키토산, 텍스트란, 히알루론산, 전분 등의 다당류의 천연 고분자 등이 단백질 약물의 서방성 제형의 매트릭스로 많이 연구되고 있다.

- 2> 리피드류는 미리스트산, 팔미트산, 스테아릴산과 같은 지방산, 파모익산(pamoic acid), 글리세릴 미리스트레이트, 글리세릴 팔미테이트, 글리세릴 스테아레이트와 같은 모노아실 글리세롤, 소비탄 미리스트레이트, 소비탄 팔미테이트, 소비탄 스테아레이트와 같은 소비탄 지방산 에스테르, 다이아실 글리세롤, 트리미리스틴, 트리팔미틴, 트리스테아린과 같은 트리글리세라이드, 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜산, 포스파티딜세린, 포스파티딜 글리세롤, 포스파티딜이노시톨, 카디오리핀과 같은 포스포리피드, 스펅고신, 세라마이드, 스펅가닌과 같은 스펅고리피드, 왁스와 이들의 염 및 유도체가 포함되며 이에 한정되지는 않는다.
- 73> 상기한 생분해성 고분자중에서도 특히, PLA, PGA, PLGA 등의 폴리에스테르 계열은 체내에서 가수분해되어 인체에 무해한 락트산과 글리콜산으로 대사되어 생체 적합성과 안정성이 인정된 물질이고, 생체 분해 속도도 고분자의 분자량, 두 단량체의 비율, 수친화성 등에 따라 짧게는 1-2주에서 길게는 1 내지 2년까지 다양하게 조절할 수 있으며, 이미 미국 FDA를 비롯하여 수십개국에서 허가되어 상용화되고 있는 고분자 물질로서, 본 발명에 바람직하게 사용될 수 있다. 특히, PLGA와 PLA 등의 폴리에스테르 계열의 고분자가 본 발명에 바람직하게 사용될 수 있다.
- 74> 단백질을 상기한 바와 같은 고분자 매트릭스 내로 포획하기 위해 코아세르베이션, 분무 건조에 의한 캡슐화, 유기 또는 수상 중의 용매 증발법 등이 이용될 수가 있다. 대부분의 단백질 약물은 수용성이기 때문에 상기 방법 중에서도 이중 에멀전 / 용매 증발법 (W/O/W 또는 double emulsion / solvent evaporation)이 단백질 약물 함유 서방성 미세 입자 제조에 많이 이용되어져 왔다. 이 방법은 단백질 또는 수용성 약물이 용해되어 있는 수용액상을 생체 분해성 고분자가 용해되어 있는 유기용매 상에 가한 후 초음파분쇄기 또는 호모게나이저 등의 기구를 사용하여 일차 에멀전을 만든 후 이를 폴리비닐알코올 등의 계면 활성제를 함유하는 2차 수용액상에

분산시킴으로써 이차 에멀전을 만든다. 이 시스템에 가열 또는 감압 조건을 가하여 유기용매를 제거하면 고분자가 고형화되면서 미세 입자가 되고 이 입자들을 원심분리 또는 여과 등의 방법으로 회수한 후 동결 건조하여 단백질 약물이 함유된 생체 분해성 미세 입자를 얻게 된다.

- 75> 단백질을 생체 분해성 고분자 내로 포획하는 과정 중에 나타나는 단백질의 변성과 비가역적 응집현상을 최소화하기 위해 단백질의 수용성 용액에 안정화제, 예를 들어 트리할로오스, 만니톨, 덱스트란, 폴리에틸렌글리콜 등을 사용할 수 있으며, 이러한 안정화제들은 단백질 주변에 수화층을 형성함으로써 단백질과 유기용매와의 상호작용을 줄여 단백질의 변성 및 비가역적 응집을 어느 정도 막아준다. 또한, 단백질 약물을 수용액에 용해시키는 대신 분말 상태로 바로 유기용매에 균일 상태로 분산시킴으로써 제조 과정 중에 단백질의 변성을 최소화시킬 수 있다.
- 76> 본원에서 사용된 용어 '지속적 방출 또는 서방출'이란 본 발명의 백신 조성물에 포함되는 면역증강제인 IL-12가 주변 매질로 대부분의 활성 물질을 방출시키는데 걸리는 시간이 1시간 이상, 예를 들어 24시간 이상으로 연장되는 것을 의미한다.
- 77> 미립구에 기초한 약물은 경구 섭취, 이식, 또는 피부 또는 점막에의 외용에 이용될 수 있다. 이식이 바람직한 경우, 미립구는 피하 이식될 수 있으며, 보철의 일부를 구성하거나 체강에 삽입될 수 있다. 주사기를 사용한 피하 이식은 이식물을 직접적으로 피하 조직에 주사하는 것으로 구성되며, 특히 서방 약물을 전달하는데 효과적인 방법이다. 본 발명에 따른 IL-12가 봉입된 서방성 미립구를 생리학적 완충액에 현탁한 후 목적하는 부위에 주사기를 통해 도입할 수 있다.
- 78> IL-12가 봉입된 서방성 미립구를 신체의 목적하는 부위에 바람직한 모드로 적용하면, IL-12가 미립구를 통해 확산되거나 미립구가 체액과의 접촉에 의해 생체내로 분해됨으로써 IL-12가 서

방출된다. 미립구가 주입된 부위에서 분해되는 경우, 분해의 정도, 즉 활성물의 방출 속도는 미립구의 가교(crosslinking) 정도에 의해 조절될 수 있다.

- 79> IL-12가 봉입된 서방성 미립구는 직경이 약 20nm 내지 50 $\mu$ m일 수 있다. 이러한 크기의 미립구는 약제학적 완충액에 현탁하여 주사기를 사용하여 환자에게 도입될 수 있다.
- 80> 본 발명의 IL-12가 봉입된 서방성 미립구를 포함하는 백신 조성물은 예방 또는 치료 백신으로 투여될 수 있다. 즉, 본 발명의 백신 조성물은 병원체에 의해 발병되는 질병 상태가 나타나거나 나타나지 않은 환자에게 투여되어 발병을 억제하거나 지연하거나 완화하거나 제거하는데 사용될 수 있다.
- 81> 본 발명의 예방 또는 치료용 백신 조성물은 예방 또는 치료를 위한 면역학적 유효량으로 투여된다. 용어 '면역학적 유효량'은 면역 반응을 유도하기에 적합한 용량으로서, 특정 용량은 연령, 체중, 중증도, 투여 방법 등에 따라 달라질 수 있으며, 적합한 용량은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 백신 조성물은 임의로 약제학적 또는 생리학적으로 허용되는 비히클, 예를 들어 생리적 또는 인산염 완충된 염수 또는 에탄올, 폴리올, 예를 들어 글리세롤 또는 프로필렌 글리콜에 투여될 수 있다.
- 82> 본 발명의 백신 조성물은 임의로 추가의 면역증강제, 예를 들어 식물성유 또는 이의 에멀전, 계면 활성 물질, 예를 들어 헥사데실아민, 옥타데실 아미노산 에스테르, 옥타데실아민, 리소레시틴, 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드, N,N-디옥타데실-N',N'-비스(2-하이드록시에틸프로판디아민), 메톡시헥사데실글리콜, 및 플루로닉 폴리올; 폴리아민, 예를 들어 피란, 덱스트란 설페이트, 폴리 IC. 카보폴; 펩타이드, 예를 들어 디메틸글리신; 면역 자극 복합체; 오일 에멀전; 리포폴리사카라이드, 예를 들어 MPL(3-O-탈아실화된 모노포스포릴 리피드 A; RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.); 무기 겔 등을 포함할 수 있다.

- 83> 본 발명의 백신 조성물은 다양한 경로, 비경구, 동맥내, 피내, 경피, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 경구 및 비강으로 투여될 수 있다.
- 84> 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것으로서 본 발명은 이에 제한되는 것으로 간주되지 않는다.
- 85> 실시예 1 : IL-12가 봉입된 미립구와 공미립구의 제조
- 86> 이중 에멀전 (W/O/W) / 용매 증발법 (double emulsion (W/O/W) / solvent evaporation method)을 이용하여 미립구를 제조하였다.
- 87> PBS 완충액에 뮤린 재조합 인터루킨-12 단백질 (rIL-12)(R & D System), 소혈청 알부민 (BSA)를 표 1의 농도가 되게 조제하고(W1, 총량 500 $\mu$ l), 이를 고분자 담체로서의 PLGA (polylactide-co-glycolide)와 유화제로서 Pluronic L121를 가한 DCM (dichloromethane) 1.2ml(0)에 호모게나이저 (homogenizer)를 이용하여 유화시켰다 (1차 에멀전, W1/O). 이를 다시 유화제로서 PVA (polyvinylalcohol)를 함유한 증류수(W2)에 호모게나이저로 유화시켜 2차 에멀전을 조제하였다 (W1/O/W2). 생성된 에멀전을 고화시켜 미립구를 생성시키고 여과한 후 건조시켜 사용하였다.

## 88&gt; 【표 1】

W1			Oil		W2
mIL-1	BSA	완충액	PLGA	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1% PVA
50 $\mu$ g	12.5mg	500 $\mu$ g	500mg	1.2ml Pluronic L121(2%)	

- 89> 제조된 미립구의 입자 크기는 레이저 분산 입자 크기 분포 분석기 (Laser scattering particle size distribution analyzer (Hydro-2000MU, MALVERN)), 형태는 광학 현미경 (Optical microscope (IX70, Olympus)), SEM(JSM 890, JEOL LTD), 로딩(%)은 SE-HPLC(TOSOH), Dc 단백질 분석기 (Bio-Rad)로 분석하였다.
- 90> 음성 대조군의 공미립구는 rIL-12를 제외하는 것 이외는 모두 동일하게 제조하였다.
- 91> 실시예 2 : IL-12 봉입 미립구에 의해 증가된 HBsAg 특이 항체 면역반응
- 92> 미립구가 항체 반응에 미치는 효과를 조사하기 위해서 B형 간염 바이러스의 표면 항원인 HBsAg (유박스 B, (주)엘지씨아이) 과 실시예 1의 방법으로 제조된 미립구를 5주령의 생쥐 (BALB/c, crSLC)에 기술된 양을 100 ul의 현탁용액 (3% carboxy methyl cellulose, 8.7mg/ml NaCl, 0.1% Tween 20)에 혼합하여 피하 경로로 면역화시킨 후, 4주 후에 혈액 내의 총 IgG, IgG1, IgG2a 수준을 anti-S ELISA 방법을 이용하여 항체 면역반응을 관찰하였다. 도 1a, 도 1b, 도 1c, 도 2a, 도 2b 및 도 2c는 O.D 450nm 값을 측정하여 항체반응을 비교하였고, 도 1d, 도 1e 및 도 1f는 종점 희석 검정 (end-point dilution assay) 방법을 이용하여 항체면역반응을 정량 비교하였다.
- 93> 도 1a에서 볼 수 있듯이, rIL-12가 봉입된 미립구를 첨가한 그룹 4에서 가장 강한 총 IgG 항체가 관찰되었고 [참조 : 도 1a], 도 1d에 따르면 다른 그룹에 비해 약 9 내지 27배 강한 총 IgG 항체가 생성되었음을 확인할 수 있다. 그러나, 공미립구가 첨가된 그룹 2와 공미립구 +rIL-12 단백질이 첨가된 그룹 3에서는 항체값의 의미 있는 증가가 관찰되지 않았다 [참조:



도 1a 및 도 1d]. IgG1 수준 역시 rIL-12 봉입 미립구가 첨가된 그룹에서 약 9배 강한 가장 강한 항체 반응을 유도되었다 [참조 : 도 1b 및 도 1e]. 특히 IgG2a 수준의 경우 rIL-12 봉입 미립구 첨가 그룹만이 의미 있는 월등히 높은 항체 반응을 유도하였다 [참조 : 도 1c]. 도 1f에 따르면 그룹 4에서 다른 그룹에 비해 81 내지 2187배 증가된 IgG2a 항체 반응이 관찰되었다.

94> 이러한 결과는 rIL-12 봉입 미립구에 의해 항체 반응과 Th1 면역 반응을 증가시킬 수 있음을 나타내며, IL-12를 지속적으로 방출할 수 있도록 고안된 본 미립구가 IL-12의 면역증강제의 효과를 월등히 증가시킬 수 있음을 의미한다.

95> 또한, 도 2에서 볼 수 있듯이, 항원의 투여량을 달리하여 면역시킨 후 미립구의 면역증강 효과를 anti-S ELISA 방법을 통하여 관찰한 결과, 소량의 항원을 사용하더라도 IL-12 봉입 미립구를 함께 투여함으로써 보다 높은 항체 반응이 나타났으며, 이러한 결과는 항원의 투여량에 관계없이 본 미립구가 잘 작용함을 보여주는 것이다 [참고 : 도 2a 내지 도 2c].

96> 실시예 3 : IL-12 봉입 미립구에 의해 증가된 HBsAg 특이 CTL 면역반응

97> IL-12 봉입 미립구가 CTL 면역반응에 미치는 효과를 조사하기 위해서 HBsAg (유박스 B, (주)엘지씨아이)과 미립구를 5주령의 생쥐 (BALB/c, crSLC)에 100 ul의 현탁용액 (3% carboxy methyl cellulose, 8.7mg/ml NaCl, 0.1% Tween 20)에 혼합하여 피하 경로로 면역시킨 후, 13주 (1차 실험) 후와 9주 및 24주 (2차 실험) 후에 비장을 분리한 후 CD8+ T 세포를 자기 비드 분리 (MACs) 방법을 이용하여 분리하였다. 이렇게 분리된 CD8+ T 세포를 기존에 알려진 HBV S 특이 CTL 에피토프인 IPQSLDSWWTSL을 자극제로 사용하여 IFN- $\gamma$  ELISPOT 검정을 수행하였다.

98> 도 3a는 면역시킨 지 13주 후에 관찰한 결과이다. 그 결과, rIL-12가 봉입된 미립구를 첨가한 그룹에서 그렇지 않은 그룹에 비해 월등히 증가된 CTL 반응이 유도되었고, 이러한 결과는 도 3b 및 도 3c에서 볼 수 있듯이 항체 반응 결과와 같이 면역시킨 항원의 양에 상관 없이 유사하게 나타났다. 또한, rIL-12 봉입 미립구에 의해 증가된 CTL 면역반응은 24 주가 지난 후에도 계속 유지되었다 [참고 : 도 3c].

99> 실시예 4 : IL-12 봉입 미립구에 의해 증가된 RSV 특이 CTL 면역반응

10> IL-12 봉입 미립구가 CTL 면역반응에 미치는 효과가 다른 항원에 대해서도 일어나는지 조사하기 위해서 호흡기 합포체 바이러스 (respiratory syncytial virus, RSV)를 항원으로 이용하였다. 또한, 단백질 형태의 항원이 아닌 펩타이드 형태의 항원을 사용하는 경우 및 피하 주사 방법이 아닌 비강 경로로 미립구를 투여하였을 경우에도 IL-12 봉입 미립구에 의한 면역 증강 효과가 나타나는지를 조사하고자 하였다. RSV의 CD8+ T 세포 에피토프로 밝혀진 M2/82-90 펩타이드 (Peptron(주)에서 합성)와 IL-12 봉입 미립구를 5주령의 생쥐 (BALB/c, crSLC)에 50 ul의 현탁용액 (PBS)에 혼합하여 비강 경로로 2주 간격으로 2회 면역시킨 후, 2주 후에 폐의 미립구를 분리하여 면역반응을 관찰하였다. 도 4a는 폐에 존재하는 CD8+ T 세포중 M2/82-90에 특이적인 CD8+ T 세포가 차지하는 %를 FACs를 이용하여 정량적으로 측정한 결과이고, 또 4b를 M2/82-90 특이 CTL로부터 분비되는 IFN- $\gamma$ 의 양을 FACs를 이용한 세포내 염색 방법을 이용하여 정량적으로 측정한 결과이다. 도 4a에 따르면 공미립구 첨가 그룹에 비해 IL-12 봉입 미립구를 첨가한 그룹에서 매우 증가된 M2/82-90 특이 CD8+ T 세포의 %가 관찰되었다. 또한, 도 4b에 의해 IL-12 봉입 미립구 첨가 그룹에서 그렇지 않은 그룹에 비해 매우 증가된 M2/82-90 특이 CTL로부터 분비된 IFN- $\gamma$ 가 관찰되었다. 이러한 결과는 미립구가 단백질 형태의 항원 뿐만

아니라 펩타이드 항원에도 잘 적용될 수 있음을 나타내고, 또한 항원의 종류나 미립구의 면역 경로에 상관없이 적용될 수 있음을 나타낸다.

101> 실시예 5 : IL-12 DNA 형태의 면역증강제와 IL-12 단백질 봉입 미립구 형태의 면역증강제의 면역증강 효과 비교

- 102> 단백질의 지속적인 발현을 유도한다고 알려진 DNA 형태의 면역증강제와 미립구에 봉입된 단백질 면역증강제의 면역증강 효과를 비교하기 위해서, HBsAg (유박스 B, (주)엘지씨아이)과 IL-12 봉입 미립구를 피하주사로 5주령 생쥐 (BALB/c, crSLC)에 면역시키고 2주 후에 혈액 내에 존재하는 총 IgG, IgG1, IgG2a 항체반응을 anti-S ELISA방법을 이용하여 측정하였다. 또한, HBsAg는 피하주사하고 IL-12 DNA는 근육주사하여 5주령 생쥐 (BALB/c)에 면역시키고 2주 후에 혈액 내에 존재하는 총 IgG, IgG1, IgG2a 항체반응을 anti-S ELISA방법을 이용하여 측정하였다. IL-12 발현 DNA는 ACP30 mIL-12 (POSTECH Cellular Immunology Lab.)을 사용하였다. 도 5에 따르면 IL-12 단백질 봉입 미립구 첨가 그룹 (그룹 3)에서 IL-12 DNA 첨가 그룹 (그룹 2)에 비해 월등히 증가된 HBsAg 특이적 총 IgG, IgG1, IgG2a 항체반응이 관찰되었다 [참고: 도 5a 내지 5c]. 이러한 결과는 암호화하고 있는 유전자의 지속적인 발현을 유도한다고 알려진 DNA 형태의 IL-12 보다 본 실시예에 사용된 단백질 형태의 IL-12 봉입 미립구가 면역증강제로써 월등히 우수한 효과를 나타내고 있음을 입증하는 것이다.

【발명의 효과】

- .03> 본 발명은 병원성 항원 및 서방성 미립구에 봉입된 IL-12를 포함하는 백신 조성물에 관한 것으로서, 면역증강제로 사용되는 IL-12를 미립구에 봉입함으로써 체내에서 서방출되어 면역증강제의 효과를 극대화시킬 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

(a) 병원성 항원 및 (b) 서방성 미립구에 봉입된 IL-12를 포함하는 면역 반응을 증대시키기 위한 백신 조성물.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 병원성 항원이 바이러스, 세균, 기생체 및 진균 기원으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 조성물.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 병원성 항원이 단백질 또는 펩타이드 형태인 조성물.

【청구항 4】

제1항에 있어서, IL-12가 재조합 IL-12인 조성물.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 피하 또는 비강 투여되는 조성물.

【청구항 6】

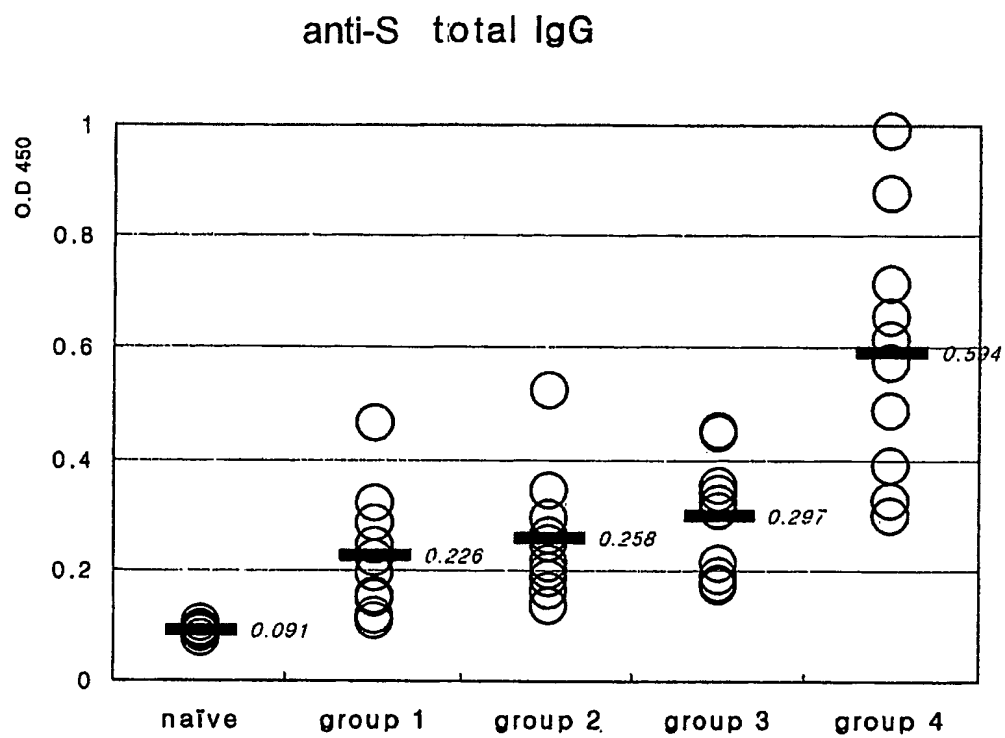
제1항에 있어서, 서방성 미립구가 이중 에멀전 용매 증발법에 의해 제조된 조성물.

【청구항 7】

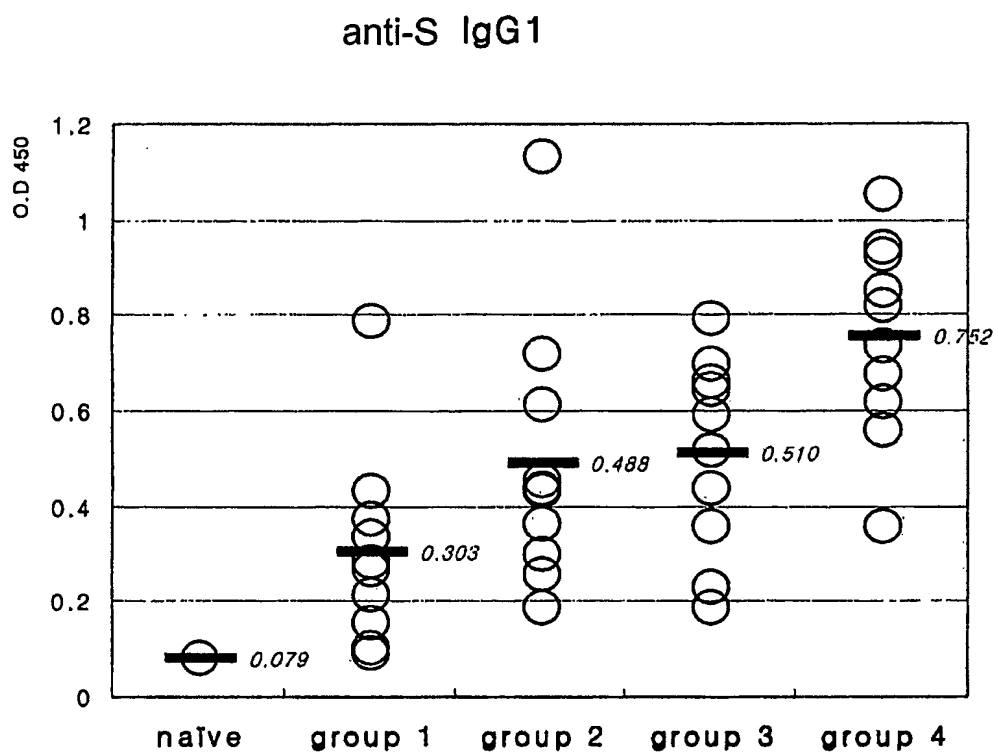
병원성 항원을 포함하는 백신 조성물에 서방성 미립구에 봉입된 IL-12를 면역증강제로 사용함을 특징으로 하여, IL-12의 면역증강 효과를 증대시키는 방법.

## 【도면】

【도 1a】



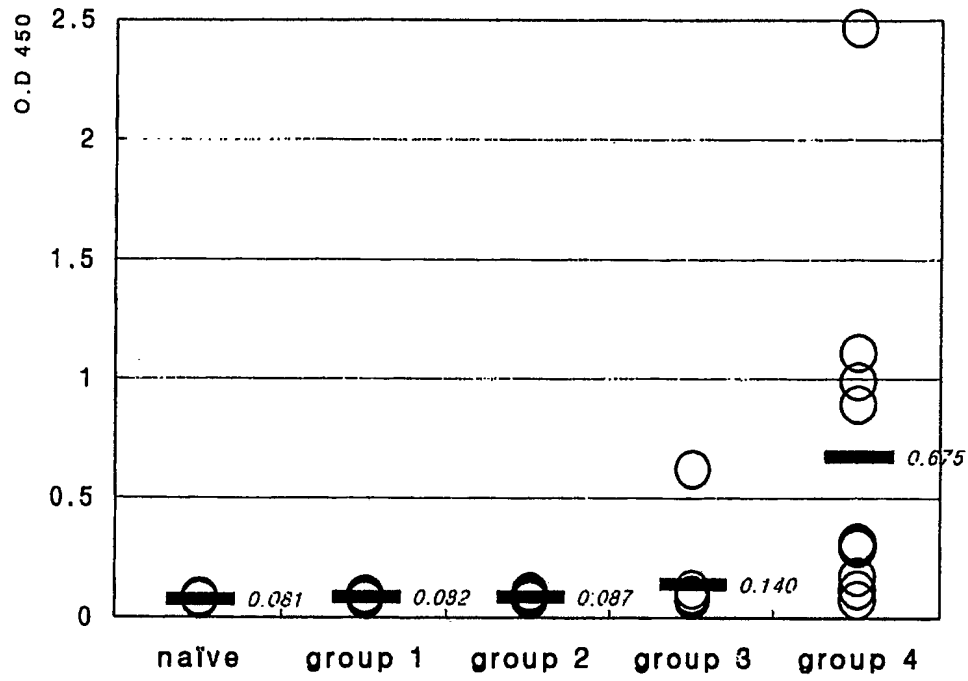
【도 1b】



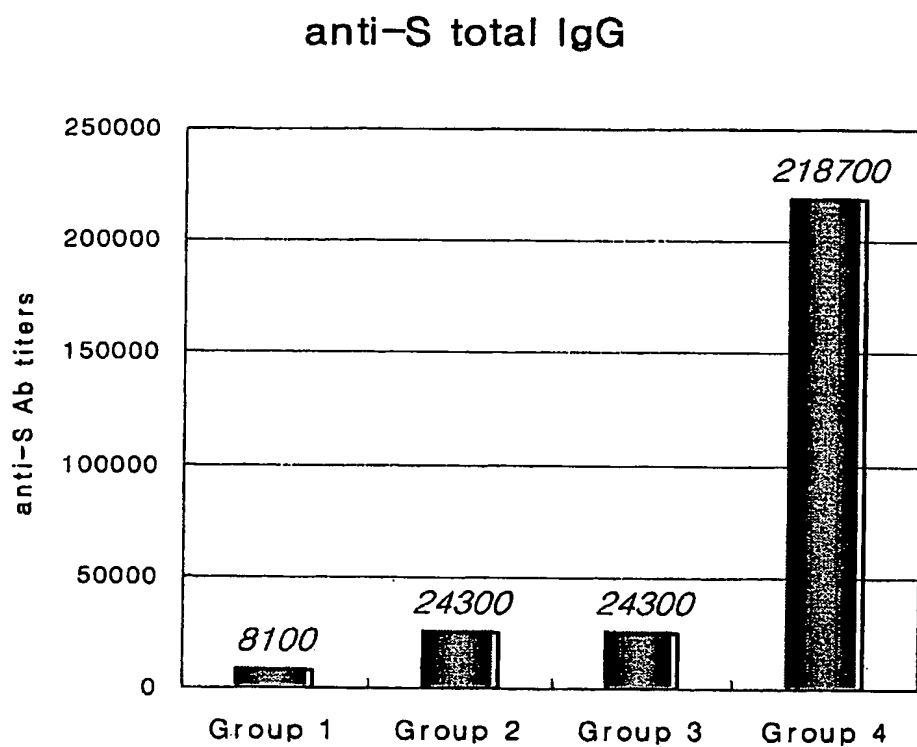


【도 1c】

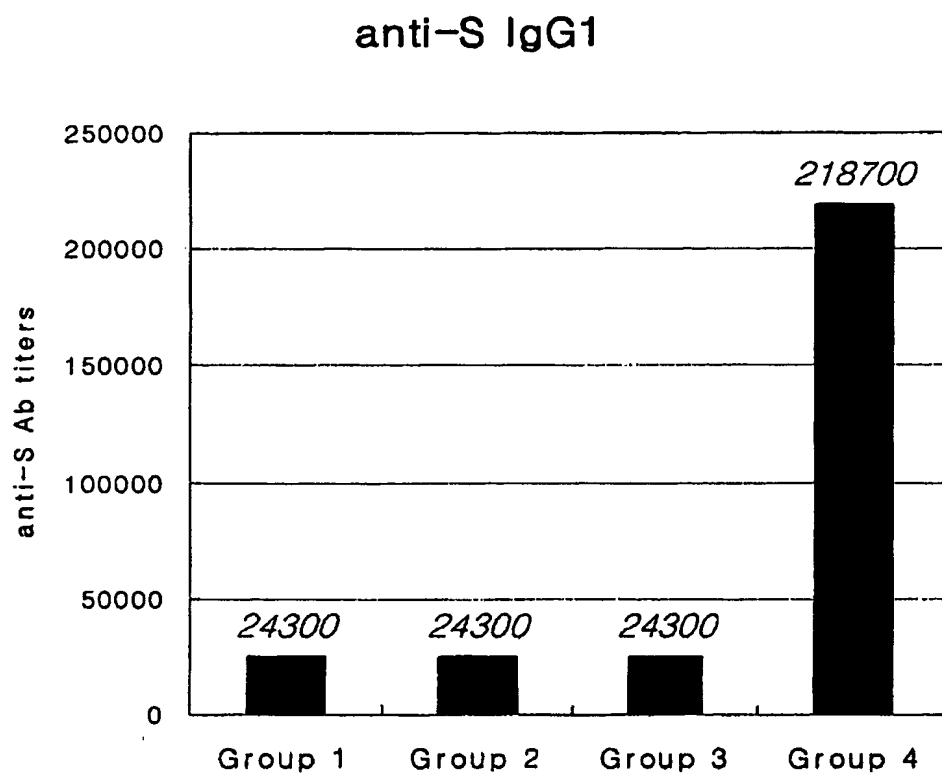
anti-S IgG2a



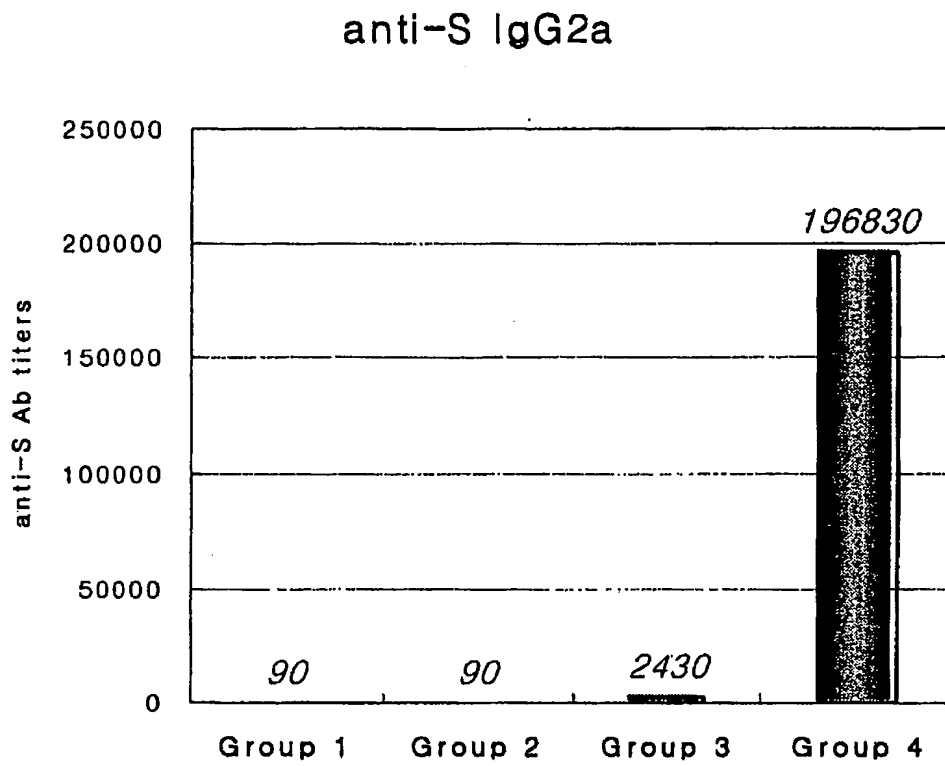
【도 1d】



【도 1e】

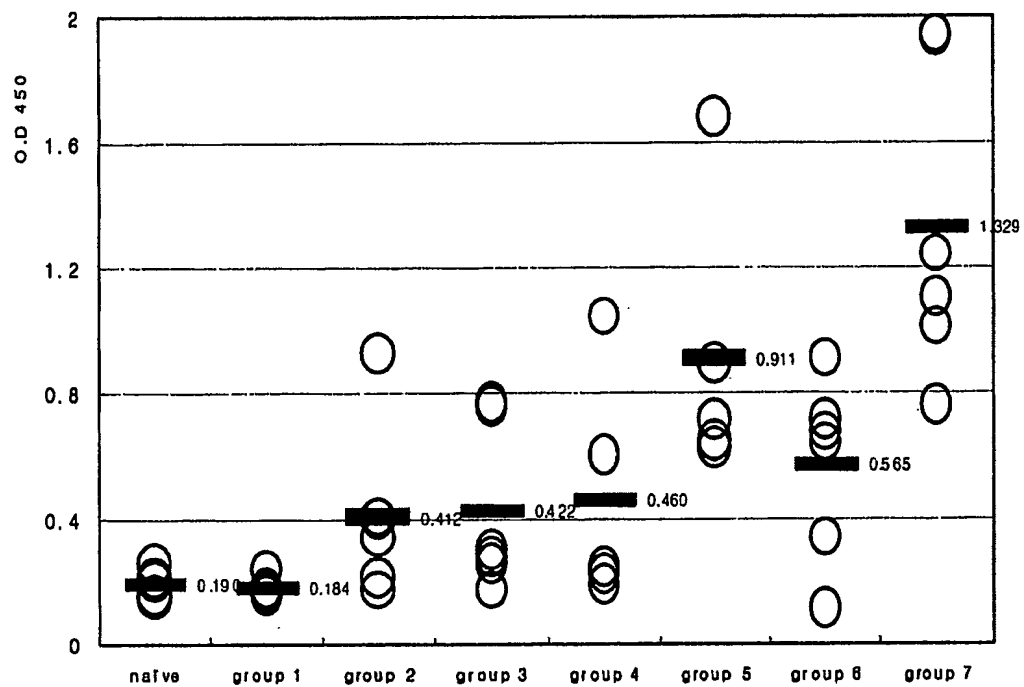


【도 1f】



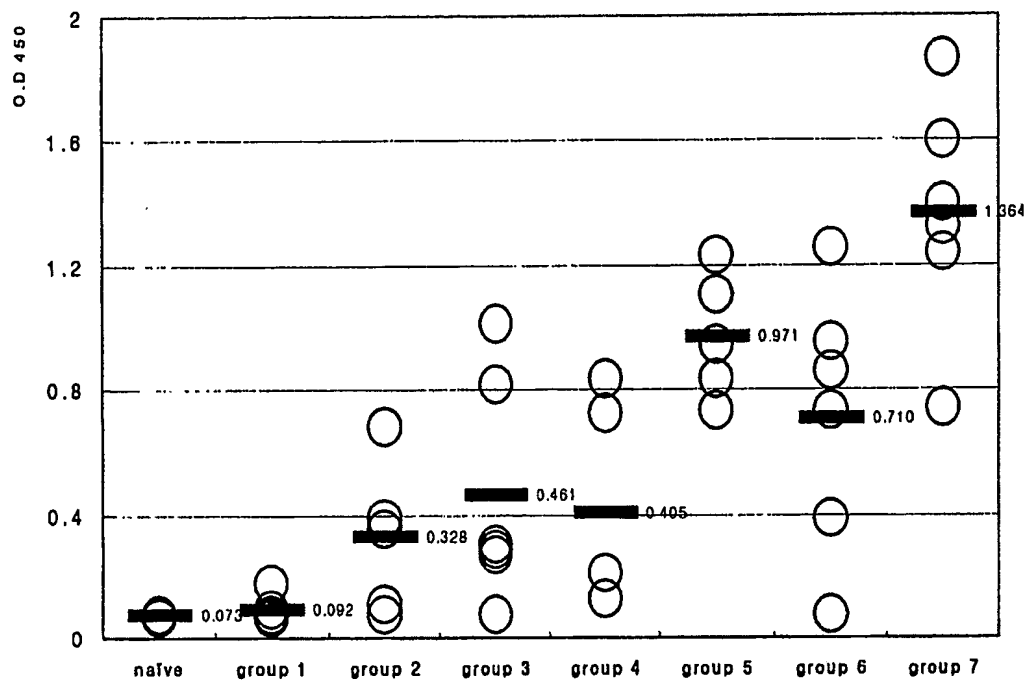
【도 2a】

## Total IgG



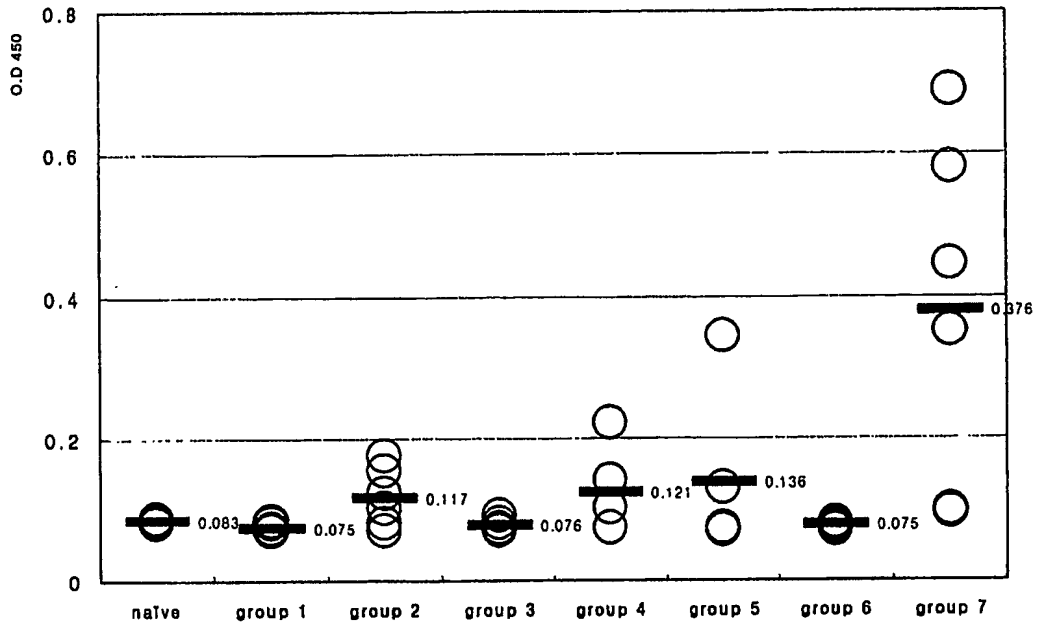
【도 2b】

IgG1

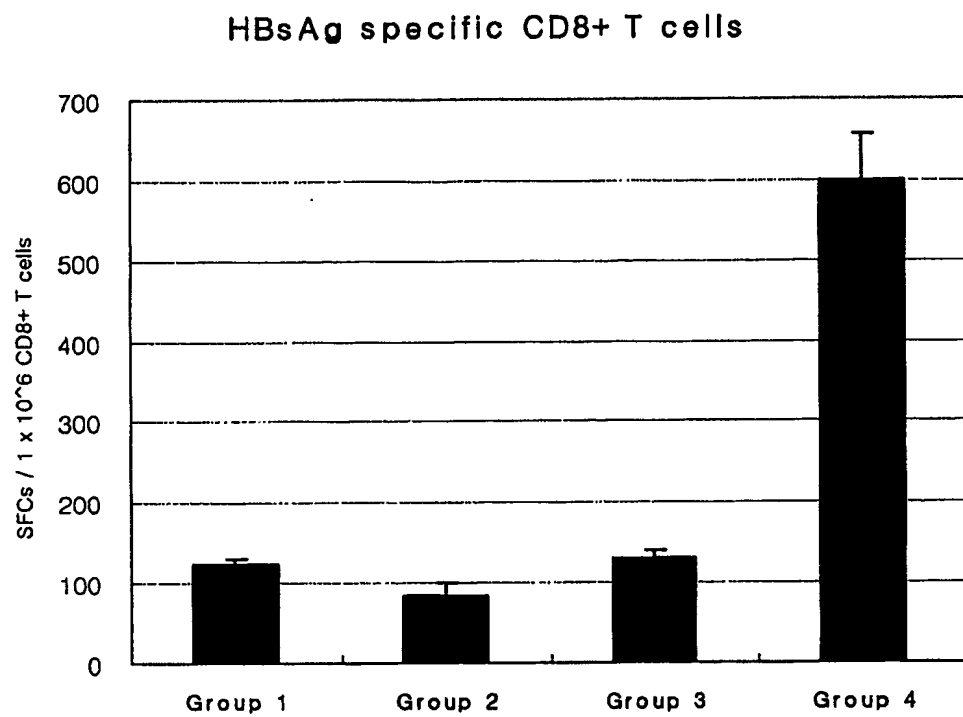


【도 2c】

IgG2a

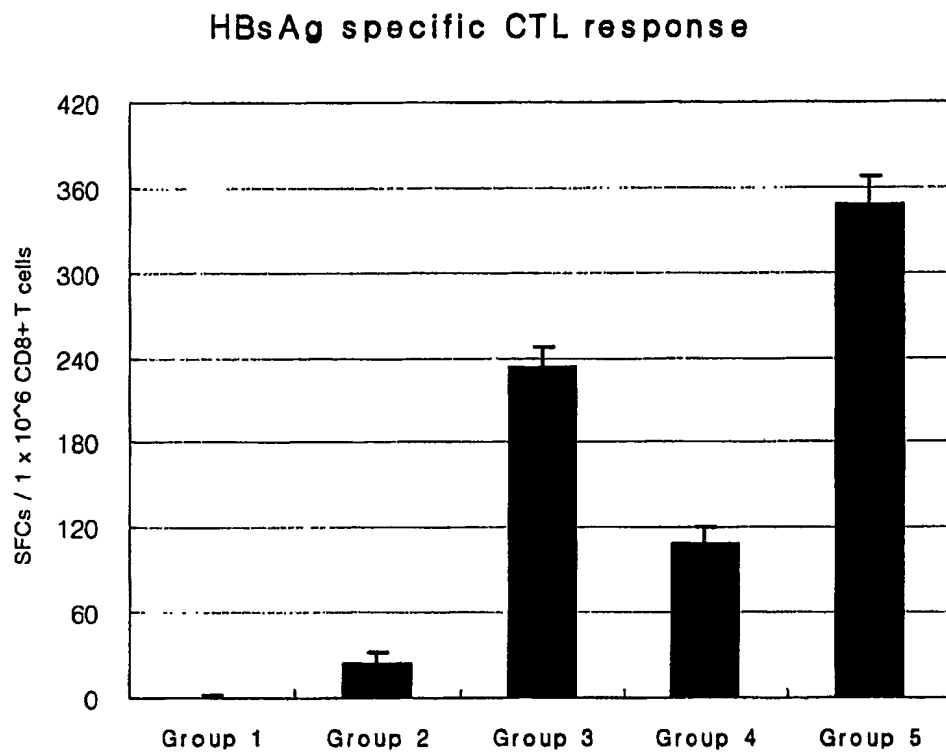


【도 3a】



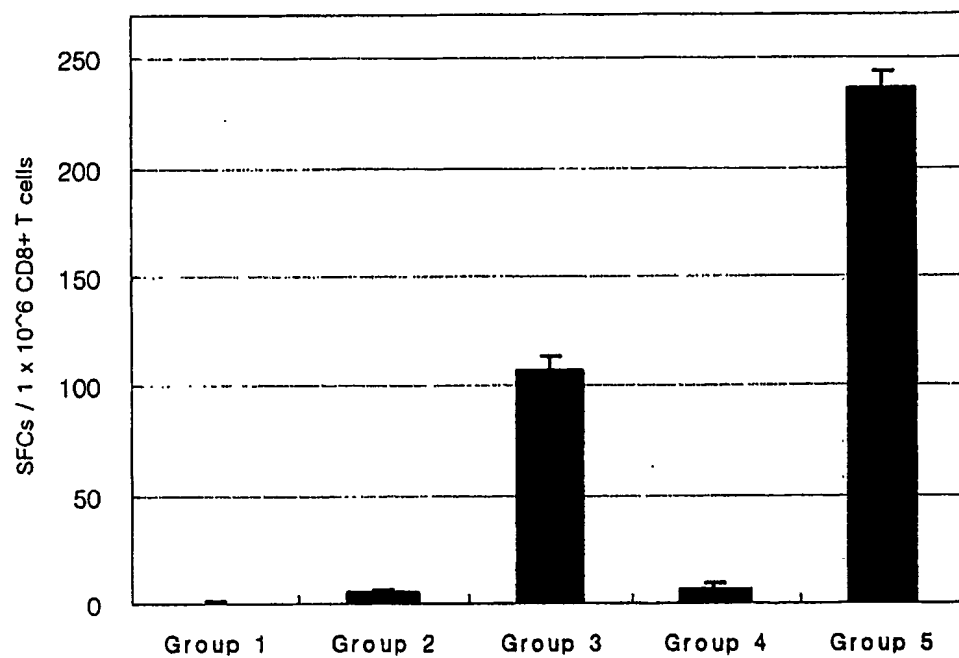


【도 3b】



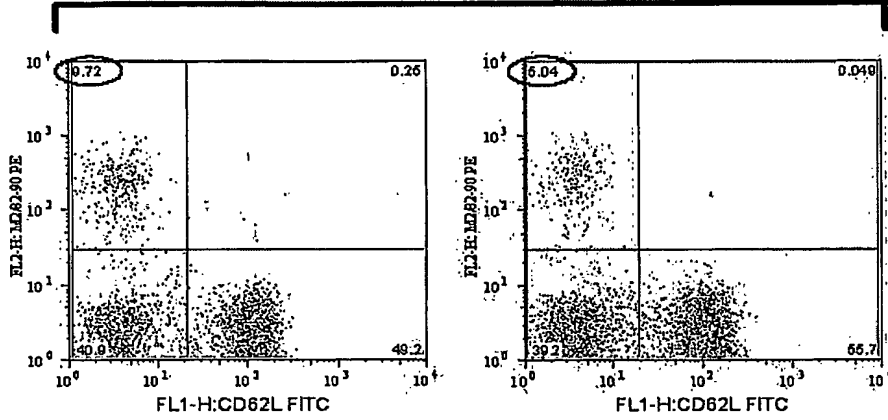
【도 3c】

## HBsAg specific CD8+ T cells

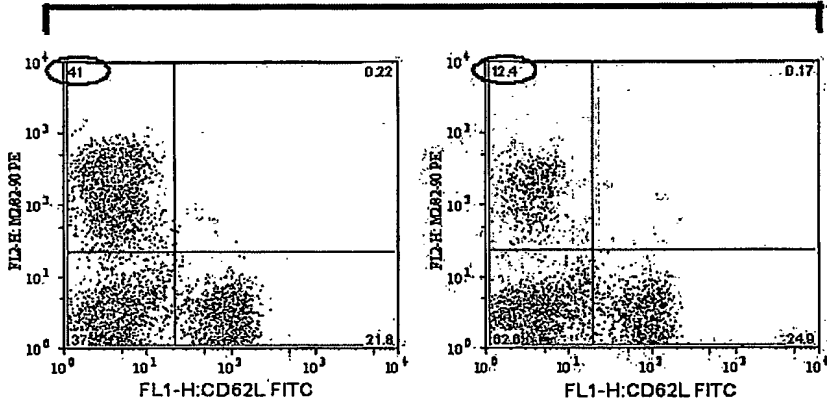


【도 4a】

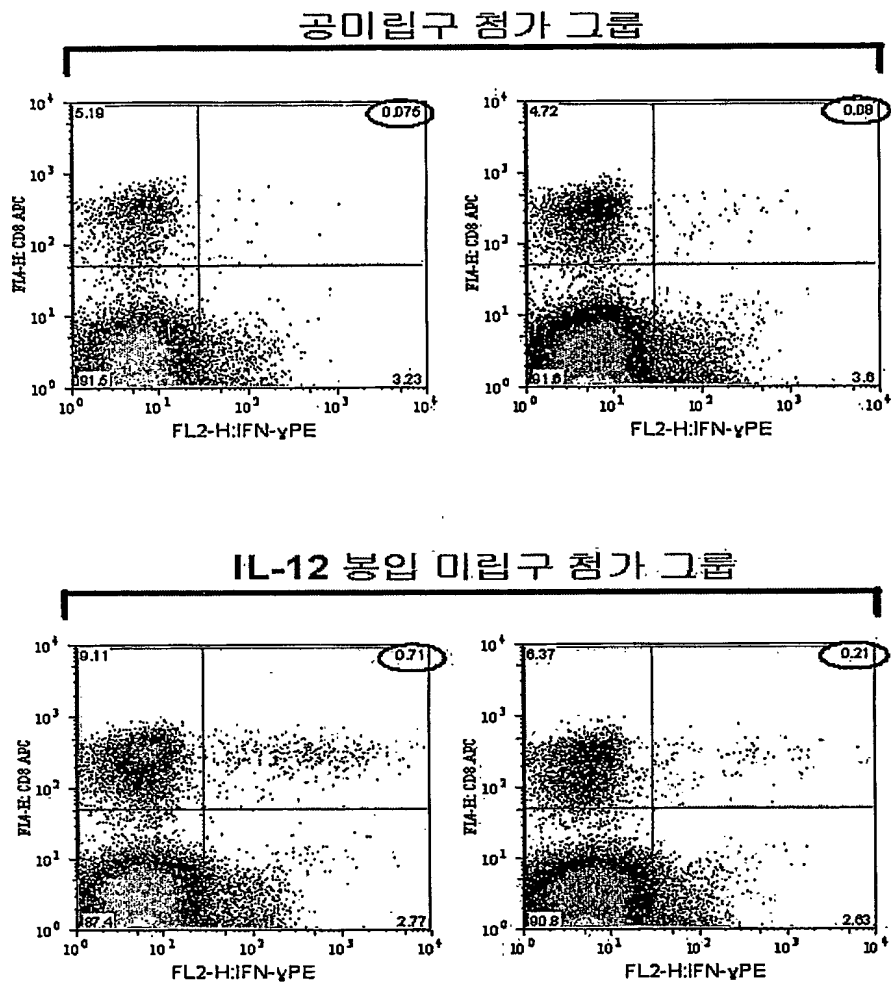
공미립구 첨가 그룹



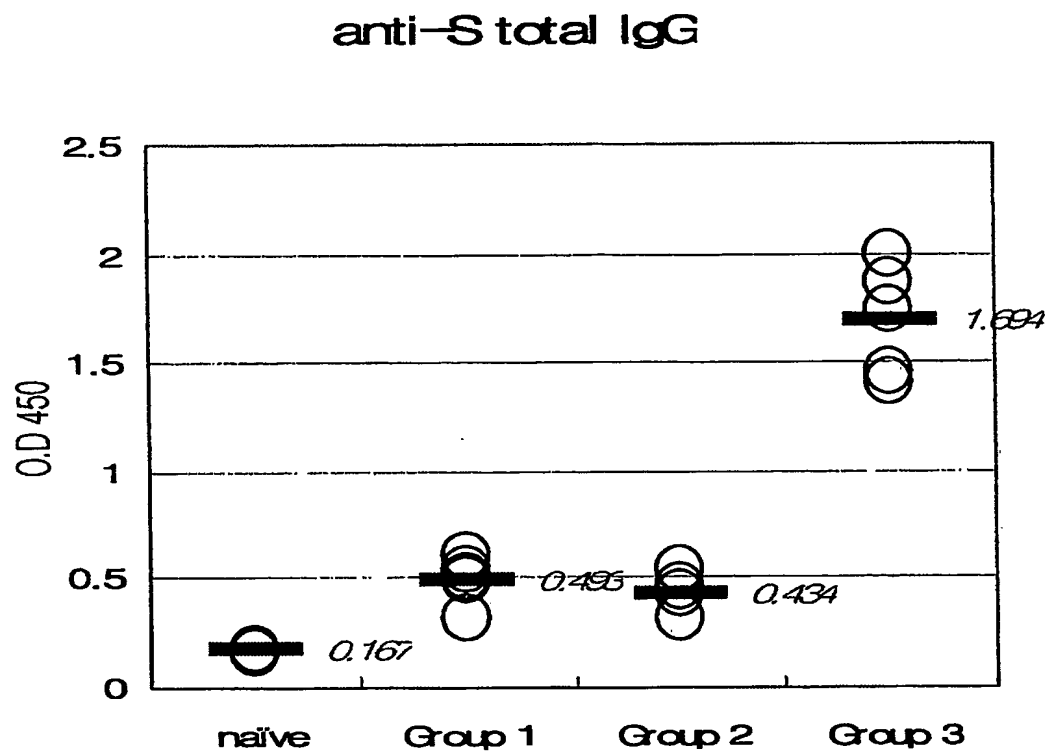
IL-12 봉입 미립구 첨가 그룹



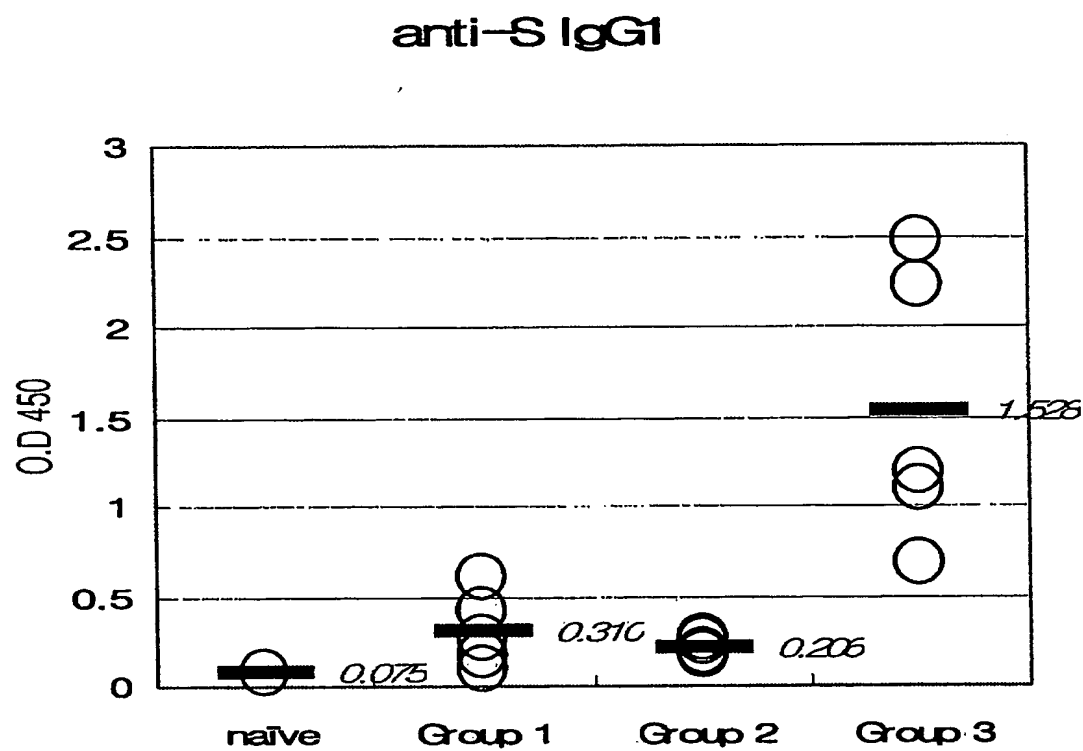
【도 4b】



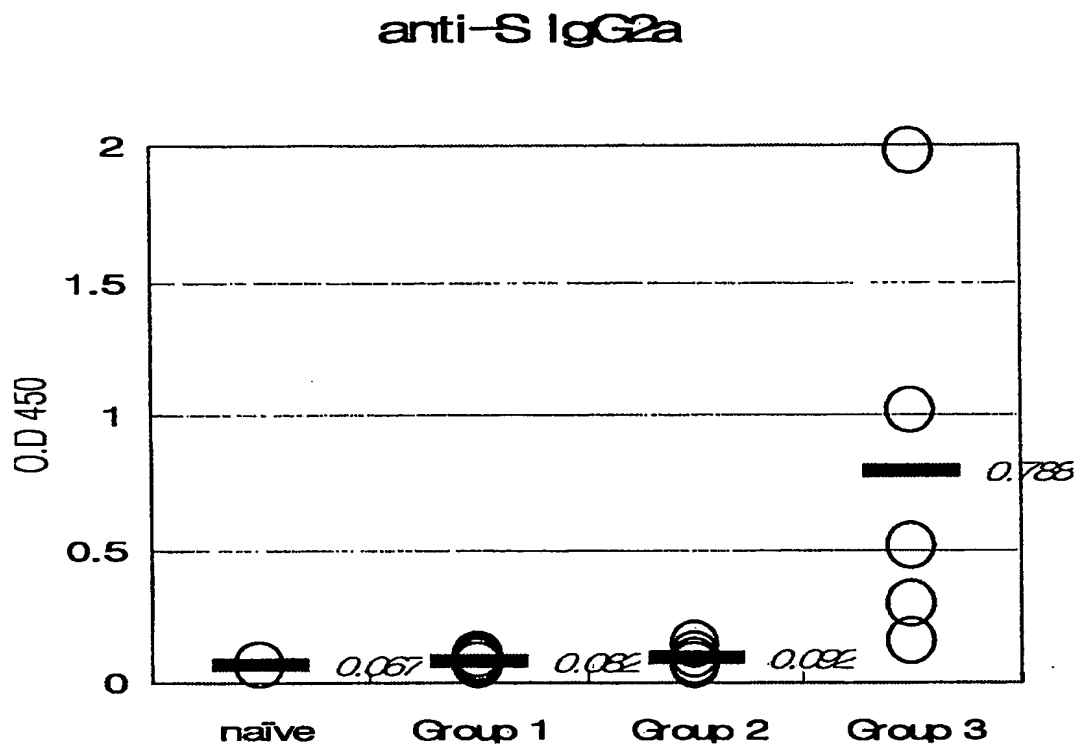
【도 5a】



【도 5b】



【도 5c】



# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/002306

International filing date: 09 September 2004 (09.09.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR  
Number: 10-2003-0063343  
Filing date: 09 September 2003 (09.09.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 19 November 2004 (19.11.2004)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKewed/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**